

Talking to chromatin : polycomb function in gene environment interactions

Citation for published version (APA):

Prickaerts, P. (2012). *Talking to chromatin : polycomb function in gene environment interactions*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20120622pp>

Document status and date:

Published: 01/01/2012

DOI:

[10.26481/dis.20120622pp](https://doi.org/10.26481/dis.20120622pp)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.



Summary



To control the utilization of genetic information, a cell makes use of specific epigenetic regulatory mechanisms. These mechanisms operate at the level of DNA (DNA methylation), RNA (non-coding RNAs) and protein (covalent histone modifications), and determine which genes are active, and thus which proteins are expressed by a cell. As the specific combination of proteins within a cell determines its phenotype (cellular identity and function), tight maintenance of gene activity is important. The Polycomb complexes (PRC1/2) studied in this thesis play an important role in this respect; they are part of a cellular transcriptional memory system that maintains the inactive status of specific target genes (gene silencing). PRCs act on histone proteins, the structural proteins around which DNA is wrapped, and that are part of the macro-molecular structure in which nuclear DNA is organized (chromatin). Chemical modification of histone proteins either favors gene silencing or gene activation, depending on the type and combination of modifications as well as their exact location (*i.e.* the exact amino acid involved). Polycomb repressive complex 2 (PRC2) trimethylates lysine 27 of histone 3 (H3K27me3) through the catalytic activity of the EZH subunit; this epigenetic mark is generally associated with transcriptional repression. PRC1 recognizes and binds H3K27me3 via a binding pocket embedded in the CBX subunit, and in doing so, is thought to maintain gene repression. A brief historical overview on genetics and epigenetics and the basic biological concepts involved in epigenetic regulation, with a focus on PcG biology, are described in **chapter 1**.

Despite significant progress over the last decennium on our understanding of PRC-function, the establishment and maintenance of repressive chromatin and the heritability of PRC-mediated silencing, numerous questions remain. How is Polycomb/chromatin-association dynamically regulated during development and differentiation? What is the effect of post-translational modification (PTM) of PRC proteins and/or histone proteins? Does PTM act on chromatin recruitment, complex composition or regulation of catalytic activity? How is PRC-mediated silencing and TrxG-mediated gene activation balanced? How does the micro-environment control PRC-function and how does this contribute to development, differentiation and disease? Can any of these mechanisms be exploited for therapeutic purposes?

A steadily growing number of studies suggest that PRC-function is subject to control by intrinsic and external factors, however very little is currently known on the dynamic regulation of Polycomb-function by the micro-environment. As PRC proteins play an important role in both normal and abnormal development (cancer), the aim of this thesis is to increase our understanding on environment-mediated control of PRC-function. This is done by identifying and probing the function of novel

interaction partners, by interrogating regulatory mechanisms, and transcriptional regulation of PRC target-genes in response to changes in the micro-environment; kinase signaling (**chapter 2**), mitogenic stimulation (**chapter 3**), induction of cell stress (**chapter 4**), and oxygen deprivation (**chapter 5 & 6**).

Our previous observation that MAPKAP kinase 3 (MK3) is a binding partner for PRC1 provides a strong indication for a role of the microenvironment in regulation of Polycomb-function. MK3 integrates signaling through mitogen- as well as stress-activated protein kinases (M/SAPK). However, the exact role of MK3 within the Polycomb complex remained elusive. In **chapter 2** we study the effect of MK3 on Polycomb-function and cell phenotype by increasing or reducing the expression of MK3. We show that MK3 overexpression induces a senescence-like cell-cycle arrest, characterized by stabilization of P53, induction of its downstream target P21^{CIP1/WAF1}, and increased expression of CDKN2A/INK4A, a locus known to be epigenetically controlled by Polycomb- Group repressive complexes. Loss of Polycomb also induces a senescence-like state, suggesting that MK3 overexpression and PcG knockdown act in similar pathways. In good agreement with this we find reduced expression of the catalytic PRC2 subunit EZH2 and concomitant loss of epigenetic H3K27me3-marking and CBX8/chromatin-occupation at the CDKN2A/INK4A-locus. Furthermore we show that co-expression of the Polycomb protein Bmi1 bypasses MK3-induced senescence and restores global H3K27me3 levels, supporting a role for MK3 in control of proliferation and replicative life-span through concerted action with Bmi1. Relevantly, MK3 overexpression also induces senescence in cancer cells through apparent reactivation of 'dormant' senescence checkpoints. In contrast to the proposed role for MK3 as a potential tumor suppressor, the tumor-suppressive effect of MK3 overexpression we observe, suggests that MK3-overexpression evokes a condition similar to oncogene-induced senescence (OIS). Paradoxically, loss of MK3 also limits proliferation of primary fibroblasts. We show that (see: **chapter 3**) MK3 controls ERK, p38 and JNK expression and/or phosphorylation and that gain or loss of MK3-function results in senescence due to signaling imbalance in primary cells.

To further elucidate the mechanistic link between MK3 and PRC we test the hypothesis that activation of MAPK signaling cascades leads to phosphorylation and chromatin-dissociation of PRC proteins, thereby relieving transcriptional repression and allowing for gene activation. We and others have already shown that protein phosphorylation accompanies PRC-protein/chromatin-dissociation during cell cycle progression. In addition, previous work established that BMI1 phosphorylation is, at least in part, dependent on MK3. In **chapter 3** we study the effect of MK3 on

PRC/chromatin-association in the context of mitogenic stimulation. Mitogenic stimulation results in loss of chromatin-binding of certain PRC proteins; chromatin-dissociation is dependent on the activation of MAPK (ERK) and SAPK (p38) signaling cascades, both of which are upstream of MK3. We find that phosphorylated ERK directly interacts with PRC1 members upon activation and that H3S28-phosphorylation (H3S28ph), the serine immediately adjacent to the H3K27me3 mark, is controlled via P38-signalling. By using the *immediate early gene* *ATF3* as a model system, we confirm that expression of PRC target genes is induced through combined ERK and p38 signaling. We establish that H3S28ph in itself is not sufficient for *ATF3* induction, and that concomitant loss of local H3K27me3 promoter-marking is not required for *ATF3* activation. In addition, we provide evidence that transcriptional re-silencing of *ATF3* is controlled by MK3 via a negative feed-back mechanism on pERK and/or pMEK, most likely involving induction of DUSPs. The existence of a negative feedback loop involving MK3 and ERK is confirmed by in vivo experiments, in which we establish a negative regulatory effect of *dMK* in the context of ERK-induced ectopic wing vein formation.

PcG proteins themselves are also targeted for post-translational modification (PTM). Currently, near 120 different PcG-phosphorylation sites have been documented, most of which have not been functionally defined. In **chapter 4** we hypothesize that signaling through phosphorylation cascades affects the PcG-interactome. To study a possible role of PTMs in PRC-interactions, we ask whether cellular stress induces novel interactions with the mammalian PRC protein BMI1. This recently led to the identification of the heterochromatin protein KAP1; we show that both proteins are recruited to the chromatin in response to environmental stress (*i.e.* by addition of arsenite or selenite) where BMI1 is targeted by KAP1 for proteolysis. We show that minimally the KAP1-RBCC domain is required for the interaction and that KAP1 degrades BMI1 in a RINGfinger-dependent manner. *Drosophila* crosses between mutant Pc (*dCBX4*) and bonus (*dKAP*) alleles substantiate the genetic interaction between these two novel binding partners. We discuss the repercussions of our findings in the context of DNA-damage control and transcriptional regulation.

The biochemical counterparts of PcG-proteins, the Trithorax-Group (TrxG) proteins, are involved in maintenance of active gene transcription, thereby functionally antagonizing PcG function. Like PcG, TrxG function is also essential for normal development and it has been implicated in stem cell biology and cancer. As recent advances in the field of epigenetics suggest that chromatin state, including the post-translational histone modifications involved, is more dynamic than originally

anticipated, we study dynamic changes in histone trimethylation in the context of cellular adaptation to changed oxygenation (hypoxic stress, reoxygenation) in **chapter 5**. To robustly detect H3K27me3-enrichment, we design a novel enrichment-finding protocol to reliably identify H3K27me3 enriched regions based on chromatin-immunoprecipitation/deep-sequencing data, including a normalization/summarization strategy, as described in **chapter 6**. Importantly, this allows us to obtain quantitative measurements of H3K27me3-marking between samples (time points). Applying this novel strategy, we reproduced a previously reported correlation between gene-body associated 'blanketing' H3K27me3-profile (PRC mark) and transcriptional repression, thereby validating our analytical approach. The prominent TSS-centered H3K4me3-enrichment (TrxG mark) at expressed loci, and the marked low nucleosome abundance right over the TSS, are also consistent with earlier findings. We charted the acute effects of changes in cell oxygenation on epigenomic distribution of PRC- and TrxG-mediated marking. Our studies support the notion that in response to oxygen-deprivation, global histone trimethyl-marking at genic regions is dramatically altered through inhibition of JHDM-function and that, as a consequence, chromatin acquires characteristics of a more primitive epigenomic state, in which H3K4me3 and H3K27me3-marking coincide (bivalency). Our data suggest that oxygen-sensing by HKDMs represents a direct link between the micro-environment and epigenetic regulatory mechanisms. We establish that H3K27me3-occupation not necessarily correlates with transcriptional repression and that, in fact, H3K4me3-enrichment is the most relevant determinant of transcription status. The relevance of our findings is discussed in the context of cancer maintenance and progression.

Taken together these studies firmly establish a role for extracellular cues and signaling pathways in regulation of PRC-function and they provide a solid basis for future research into specific processes and molecular mechanisms in epigenetic regulation of PRC-associated chromatin.



Samenvatting



Om het gebruik van genetische informatie te reguleren, heeft een cel specifieke epigenetische regelmechanismen ter beschikking. Deze mechanismen opereren op het niveau van DNA (DNA methylering), RNA (niet-coderend RNA) en eiwitten (covalente histonmodificaties) en bepalen welke genen actief zijn en dus welke eiwitten tot expressie gebracht worden door een cel. Omdat de specifieke combinatie van eiwitten in een cel bepalend is voor het fenotype (cellulaire identiteit en functie), is het van belang dat genactiviteit strikt gecontroleerd wordt. De Polycomb complexen beschreven in dit proefschrift (PRC1/2) spelen een belangrijke rol in dit opzicht; ze maken deel uit van een cellulair transcriptioneel geheugensysteem dat de inactieve status van specifieke target genen in stand houdt (gene silencing). PRCs grijpen aan op het niveau van histoneiwitten, de structurele eiwitten waaromheen DNA verpakt wordt en die deel uit maken van de macromoleculaire structuur waarin nucleair DNA georganiseerd wordt (chromatine). Chemische modificatie van histoneiwitten bevordert het uitzetten dan wel het activeren van een gen, afhankelijk van het type en de combinatie van modificaties, evenals van de exacte locatie (*i.e.* het exacte aminozuur betrokken). Het Polycomb repressieve complex 2 (PRC2) trimethyleert lysine 27 van histon 3 (H3K27me3) door middel van de katalytische activiteit van het EZH eiwit; deze epigenetische markering wordt over het algemeen geassocieerd met transcriptionele repressie. PRC1 herkent en bindt H3K27me3 via een bindingsplaats op het CBX eiwit. Men denkt dat genrepressie op deze manier gehandhaafd wordt. Een kort historisch overzicht van genetica en epigenetica en de fundamentele biologische concepten die betrokken zijn bij epigenetische regulatie, met de focus op PcG biologie, worden beschreven in **hoofdstuk 1**.

Ondanks de aanzienlijke vooruitgang die in het laatste decennium geboekt is met betrekking tot het begrijpen van PRC-functie, het initiëren en behouden van repressief chromatine en de overerving van PRC-gemedieerde silencing, blijven veel vragen onbeantwoord. Hoe wordt Polycomb/chromatine-associatie tijdens ontwikkeling en differentiatie dynamisch gereguleerd? Wat is het effect van post-translationele modificatie (PTM) van PRC eiwitten en/of histoneiwitten? Hebben PTM invloed op chromatine recrutering, complex samenstelling of regulering van katalytische activiteit? Hoe worden PRC-gemedieerde gen silencing en TrxG-gemedieerde gen activering in evenwicht gehouden? Hoe wordt PRC-functie gereguleerd door de micro-omgeving en hoe draagt dit bij aan ontwikkeling, differentiatie en ziekte? Kan een van deze mechanismen worden benut voor therapeutische doeleinden?

Ondanks het feit dat een gestaag groeiend aantal studies suggereert dat PRC-functie wordt gereguleerd door intrinsieke en externe factoren, is er momenteel nog weinig bekend over de dynamische regulering van Polycomb-functie door de

micro-omgeving. Omdat PRC eiwitten een belangrijke rol spelen in zowel normale als abnormale ontwikkeling (kanker), is dit proefschrift gericht op het vergroten van onze kennis met betrekking tot omgevingsgemediteerde controle van PRC-functie. Dit is gerealiseerd door middel van het identificeren van nieuwe interactiepartners, door het bestuderen van regulerende mechanismen en transcriptionele regulering van PRC target-genen in reactie op veranderingen in de micro-omgeving; kinase signalering (**hoofdstuk 2**), mitogene stimulering (**hoofdstuk 3**), inductie van celstress (**hoofdstuk 4**) en zuurstof deprivatie (**hoofdstuk 5 & 6**).

Onze eerdere bevinding dat MAPKAP kinase 3 (MK3) een bindingspartner van PRC1 is, geeft een sterke indicatie voor een rol van de micro-omgeving in de regulatie van Polycomb-functie. MK3 integreert signalering downstream van zowel mitogeen- als stressgeactiveerde eiwit kinases (M/SAPK). De exacte rol van MK3 in het Polycomb complex bleef echter onduidelijk. In **hoofdstuk 2** is het effect van MK3 op Polycomb-functie en celfenotype bestudeerd door het verhogen of verlagen van de expressie van MK3. We laten zien dat MK3 overexpressie leidt tot een senescence-achtig cel cyclus arrest, dat gekenmerkt wordt door stabilisatie van P53, inductie van het downstream P21^{CIP1/WAF1} eiwit en verhoogde expressie van CDKN2A/INK4A, een locus waarvan bekend is dat deze epigenetisch gecontroleerd wordt door Polycomb-Groep repressieve complexen. Verlies van Polycomb induceert eveneens een senescent fenotype, wat suggereert dat MK3 overexpressie en PcG knockdown in dezelfde signaleringsroute actief zijn. In overeenstemming hiermee vinden we verminderde expressie van het katalytische EZH2 eiwit en een gelijktijdig verlies van epigenetische H3K27me3-markering en CBX8/chromatine-occupatie op de CDKN2A/INK4A-locus. Verder tonen we aan dat co-expressie van het Polycomb-eiwit Bmi1 MK3-geïnduceerde senescence voorkomt en globale H3K27me3 niveaus herstelt, hetgeen een rol voor MK3 in de controle van proliferatie en replicatieve levensduur ondersteunt in combinatie met Bmi1. Relevant in dezen is dat MK3 overexpressie eveneens senescence induceert in kankercellen, wat gepaard gaat met reactivering van 'slapende' senescence-checkpoints. In tegenstelling tot de vermeende rol van MK3 als een tumorsuppressor, wijst het tumor suppressieve effect dat we zien erop dat MK3 overexpressie een conditie induceert die vergelijkbaar is met oncogen-geïnduceerde senescence (OIS). Ogenscheinlijk tegenstrijdig hiermee leidt verlies van MK3 ook tot verminderde proliferatie van primaire fibroblasten. We laten zien dat (zie: hoofdstuk 3) MK3 de expressie en/of fosforylering van ERK, p38 en JNK reguleert en dat verhoogde of verminderde MK3-functie resulteert in senescence als gevolg van onevenwichtige signalering in primaire fibroblasten.

Om het mechanistisch verband tussen MK3 en PRC verder te verduidelijken, testen we de volgende hypothese: activering van MAPK signalering cascades leidt tot fosforylering en chromatine dissociatie van PcG eiwitten, waardoor transcriptionele repressie wordt opgeheven en de mogelijkheid tot genexpressie ontstaat. Wij en anderen hebben al aangetoond dat eiwitfosforylering en PRC-eiwit/chromatine-dissociatie samengaan tijdens celcyclus progressie. Bovendien is in eerder werk vastgesteld dat BMI1 fosforylering in ieder geval gedeeltelijk, afhankelijk is van MK3. In **hoofdstuk 3** bestuderen we het effect van MK3 op PRC/chromatine-associatie in de context van mitogene stimulering. Mitogene stimulering resulteert in het verlies van chromatine-binding van bepaalde PRC eiwitten; chromatine-dissociatie is afhankelijk van de activering van MAPK (ERK) en SAPK (p38) signalering cascades, die beide upstream van MK3 opereren. We zien dat gefosforyleerd ERK een directe interactie aangaat met het PRC1 eiwitcomplex en dat H3S28-fosforylering (H3S28ph), de serine direct naast de H3K27me3 markering, gecontroleerd wordt via p38-signalering. Door gebruik te maken van het “*immediate early*” gen ATF3 als modelsysteem, bevestigen we dat de expressie van PRC target genen geïnduceerd wordt door middel van gecombineerde ERK en p38 signalering. We stellen vast dat H3S28 fosforylering op zich onvoldoende is voor ATF3 inductie en dat gelijktijdig verlies van lokale H3K27me3 promoter-markering niet vereist is voor ATF3 activering. Daarnaast bewijzen we dat transcriptionele her-inactivatie van ATF3 gecontroleerd wordt door MK3 via een terugkoppelingsmechanisme op pERK en/of pMEK, waarschijnlijk via inductie van DUSPs. Het bestaan van een negatieve feedbackloop, waarbij MK3 en ERK betrokken zijn, is bevestigd door in vivo experimenten, waarin we een negatief regulerend effect van dMK vaststellen in de context van ERK-geïnduceerde ectopische adervorming in vleugels van de fruitvlieg *Drosophila*.

PcG eiwitten worden zelf ook post-translationeel gemodificeerd (PTM). Momenteel zijn er 120 verschillende PcG-fosforylatie-plaatsen beschreven, waarvan de meeste nog niet functioneel gedefinieerd zijn. In **hoofdstuk 4** gaan we van de veronderstelling uit dat fosforylering van Polycomb eiwitten het PcG-interactoom beïnvloedt. Om de rol van PTMs in PRC-interacties te bestuderen, stellen we de vraag of cellulaire stress nieuwe interacties met het Polycomb eiwit BMI1 induceert. Dit leidde recent tot de identificatie van het heterochromatine eiwit KAP1; we laten zien dat beide eiwitten naar het chromatine gerecruteerd worden in reactie op omgevingsstress (bijv. na blootstelling aan arseen of seleen) waar BMI1 door KAP1 voor proteolytische afbraak gemarkeerd wordt. We tonen aan dat minimaal het KAP1-RBCC domein vereist is voor de interactie en dat afbraak van BMI1 door KAP1 RINGfinger afhankelijk is. Kruisingsexperimenten tussen fruitvliegjes mutant voor Pc (dCBX4) of bonus (dKAP)

allelen onderbouwen de genetische interactie tussen deze twee nieuwe interactie-partners. De gevolgen van onze bevindingen worden besproken in het kader van DNA-schade controle en transcriptionele regulatie.

De biochemische tegenhangers van Polycomb Groep-(PcG) eiwitten, de Trithorax-Groep (TrxG) eiwitten, zijn betrokken bij het behoud van actieve gentranscriptie, waardoor ze functioneel tegengesteld werken aan PcG. Net als bij PcG, is TrxG-functie ook van essentieel belang voor een normale ontwikkeling en is het betrokken bij stamcelbiologie en kanker. Omdat recente ontwikkelingen op het gebied van epigenetica suggereren dat de chromatine status, waaronder de post-translationele histonmodificaties die hierbij betrokken zijn, dynamischer is dan aanvankelijk werd verondersteld, bestuderen we in **hoofdstuk 5** dynamische veranderingen in histonmodificaties in de context van cellulaire aanpassingen aan gewijzigde oxygenatie (hypoxische stress, reoxygenering). Om een robuuste detectie van H3K27me3-verrijking mogelijk te maken, ontwerpen we een nieuw protocol, waaronder een normaliseringsstrategie, waarmee uit chromatine-immunoprecipitatie/deep-sequencing experimenten verkregen H3K27me3-verrijking betrouwbaar bepaald kunnen worden; dit is beschreven in **hoofdstuk 6**. Belangrijk is dat dit ons in staat stelt om een kwantitatieve bepaling te doen van H3K27me3-markering tussen verschillende condities (tijdpunten). Gebruik makend van deze nieuwe strategie, waren we in staat de eerder gevonden correlatie tussen gen-brede H3K27me3-associatie (zogenaamde “*blanketing profile*” PRC markering) en transcriptionele repressie te bevestigen, hetgeen de validiteit van onze analytische aanpak onderstreept. De prominente TSS (transcriptionele start site)-gecentreerde H3K4me3-verrijking (TrxG mark) op actieve genen en de uitgesproken lage aanwezigheid van nucleosomen direct op de TSS zijn eveneens in overeenstemming met eerdere bevindingen. We brengen de acute effecten van veranderingen in cel oxygenering op epigenomische distributie van PRC- en TrxG-gemedieerde markering in kaart. Onze studies ondersteunen het idee dat, in reactie op zuurstofonttrekking, globale histon trimethyl-markering rondom genen drastisch verandert door remming van JHDM-functie, als gevolg waarvan het chromatine een meer primitieve epigenomisch karakter verkrijgt, waarin H3K4me3 en H3K27me3 samen voorkomen (bivalentie). Onze data suggereren dat zuurstofafhankelijkheid van HKDMs een direct verband tussen de micro-omgeving en epigenetische regelmechanismen legt. We constateren dat H3K27me3-verrijking niet noodzakelijk correleert met transcriptionele repressie en dat in feite H3K4me3-verrijking de meest bepalende factor van de transcriptionele status is. De relevantie van onze bevindingen wordt besproken in de context van overleving en kwaadaardige ontwikkeling van kanker.

Samenvattend bevestigen deze studies een rol voor extracellulaire signalen en signaleringsroutes bij de regulatie van PRC-functie en leggen deze een solide basis voor toekomstig onderzoek naar specifieke processen en moleculaire mechanismen in de epigenetische regulatie van PRC-geassocieerd chromatine.